

Title	STAT3 is required for the gp130 - mediated full activation of the c-myc gene
Author(s)	木内, 庸雄
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41622
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	木 内 庸 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 6 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	STAT 3 is required for the gp130-mediated full activation of the <i>c-myc</i> gene. (IL-6, gp130シグナルでは STAT 3 が <i>c-myc</i> 遺伝子を直接活性化する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 久保 武 教 授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

インターロイキン 6 (IL-6) は、免疫系、造血系、肝などの細胞増殖、あるいは細胞分化、細胞死の制御に重要な働きをしており、その際、Jak-STAT 伝達系、特に STAT 3 を介するシグナル伝達系が重要な働きをしている。しかし、IL-6 により細胞の運命が決定される際に、そのシグナル伝達系によって具体的にどのような遺伝子が活性化され作用するかは、なお不明である。これまで我々は、M1 白血病細胞が IL-6, gp130 シグナルにより増殖を停止しマクロファージへと分化する際、*c-myc* 遺伝子の発現が低下すること、一方、同じ gp130 シグナルにより BaF 細胞が生存、増殖する際には、*c-myc* 遺伝子の発現が増加することを明らかにしてきた。同じサイトカインシグナルが *c-myc* 遺伝子の発現を正負に調節し、この差異が細胞の運命付けに重要であると思われる。今回我々は、BaF 細胞、HepG 2 細胞などで見られる、gp130 シグナルによる短時間での *c-myc* 遺伝子の活性化のメカニズムを詳細に解析した。

【対象・方法・結果】

マウス pro B cell line, BaF/B03 に、G-CSFR の細胞外ドメインと gp130 の細胞内ドメインの全長 277 アミノ酸を融合させたキメラ受容体を発現させた細胞株、BaF-G277 を用いて gp130 シグナルによる *c-myc* mRNA の発現を northern blot 法により解析した。その結果、BaF 細胞では *c-myc* 遺伝子の発現は gp130 シグナルにより速やかに上昇し 1 h でピークに達し、以後漸減した。また、サイクロヘキサミド処理下でも *c-myc* 遺伝子の発現誘導が抑えられず、むしろ増加することから、この *c-myc* mRNA の発現誘導には新たな蛋白合成を必要としないことがわかった。gp130 の細胞内ドメインの C 末端 133 アミノ酸まで削った BaF-G133 では BaF-G277 と同様、*c-myc* mRNA の強い発現誘導が見られたが、gp130 の近位部 68 アミノ酸のみを含む BaF-G68 では *c-myc* mRNA の発現誘導が認められるものの、その強さは BaF-G277 の 1/5 - 1/7 であった。この結果は、我々が既に報告していた gp130 の近位部から *c-myc* 遺伝子に到る経路の存在以外に、gp130 遠位部から起こるシグナルが存在し、IL-6 による - の発現誘導の大部分は、むしろ後者が担っていることを示すものである。gp130 の膜近傍 68-133 アミノ酸の領域には 2 つのチロシン残基が存在し (Y2, Y3)、Y2 からは SHP-2-MAP kinase 系が、Y3 からは STAT 3 が活性化されることがわかっている。この各々のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異キメラ受容体 (G133F2, G133F3)

をそれぞれ発現させた BaF-G133F 2, BaF-G133F 3 で *c-myc* mRNA の発現を見ると、前者では BaF-G277, -G133 とほぼ同程度認められたが、後者では著しくその発現が抑えられた。さらに、我々は優勢抑制型 STAT3 (F and D) を発現させた BaF-G133 で gp130 活性化による *c-myc* 遺伝子の発現誘導が抑えられることを確認した。以上から、BaF 細胞において、IL-6, gp130 シグナル系では *c-myc* 遺伝子は STAT3 応答性遺伝子のひとつであると考えられた。

次に我々は *c-myc* 遺伝子プロモーターに IL-6 / STAT3 の応答領域が存在するかを調べるために、HepG2 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイをおこなった。様々な長さの *c-myc* 遺伝子上流 (最長 2.8kb) をルシフェラーゼ遺伝子につないだ一連のコンストラクトを用いてプロモーターアッセイをおこなった結果、IL-6 は STAT3 依存性に *c-myc* プロモーターを活性化すること、その活性化には P2 プロモーターにある E2F 結合部位が必須であることが明らかになった。

さらに IL-6, gp130 刺激により誘導される *c-myc* E2F 部位結合蛋白の性状をゲルシフトアッセイにより検討したところ、典型的な STAT 結合部位である APRE と比較して、約 1 / 5 の親和性ではあるが、結合特異性、移動度などから STAT3 が直接 *c-myc* E2F 部位に結合すると考えられた。また、IL-2 により活性化された STAT5 はこの部位には結合せず、このことは IL-2 や IL-3 のシグナルで STAT5 が *c-myc* 遺伝子の活性化に直接的には関与しないとした従来の報告とも一致している。これまで、サイトカインによる *c-myc* の発現誘導は、E2F 活性を介しておこるとする報告が多かったが、BaF 細胞で E2F 活性が上昇するのは gp130 刺激後 4 - 6 時間後であり、この意味でも短時間での *c-myc* 遺伝子の活性化は E2F 活性を介してではなく、STAT3 依存的に起こると考えられる。またこの結果、gp130 シグナルのうちでも、STAT3 シグナルが、M1 細胞では *c-myc* 遺伝子の発現を抑制し、BaF 細胞では *c-myc* 遺伝子を活性化するという興味深い仕組みが明らかになった。前者では STAT3 のリン酸化が持続し、後者では STAT3 のリン酸化は一時的で、持続しないことがこの差をもたらしているのかも知れない。

【総括】

以上のように、これは STAT family のメンバーが *c-myc* 遺伝子を直接活性化とした最初の報告である。そして、IL-6 による *c-myc* 遺伝子の活性化のメカニズムの少なくともひとつとして、STAT3 が *c-myc* E2F 部位に直接結合して *c-myc* プロモーターを活性化することを示した。細胞の増殖・分化・細胞死の key regulator として、IL-6, gp130 シグナルでは、この STAT3 - c-Myc pathway は重要であると考えられる。v-src による transformation や、IL-2 による *c-myc* 遺伝子発現誘導にも一部このメカニズムが使われている可能性がある。最近報告されている STAT family の増殖活性の一つの説明としてもこのメカニズムは興味深い。

論文審査の結果の要旨

サイトカインシグナルの研究においては、STAT 転写因子群がいかなる仕組みで細胞の増殖、分化を決定しているかを明らかにすることが、この数年来最も重要課題のひとつであった。今回の研究は、IL-6, gp130 シグナルによる *c-myc* 遺伝子発現は、主に *c-myc* P2 プロモーター上の E2F 部位に STAT3 が直接作用し、転写を活性化することを明らかにしたものである。本研究は、細胞増殖の制御に重要な *c-myc* 遺伝子発現制御に STAT ファミリーのメンバーが直接関わることを明らかにし、同時に STAT と増殖関連遺伝子との連関を初めて示したものである。v-Src により STAT3 が活性化されることや、v-Src による細胞のトランスフォーメーションに STAT3 が関与することが示唆されており、本研究によって細胞のがん化におけるシグナル伝達と STAT の役割がさらに明らかにされると期待される。以上の観点に基づき、本研究は学位の授与に値するものであると考えられる。